

DETERMINAÇÃO BIOLÓGICA DE RESÍDUOS DE INSETICIDAS ORGANO-FOSFORADOS EM ALFACE (*Lactuca sativa* L.)¹

J.V. DE OLIVEIRA² G.C. DE BATISTA³

ABSTRACT

Biological determination of organophosphorus in
secticide residues on lettuce (*Lactuca sativa* L.)

Initially, standard solutions of technical insecticides dichlorvos, mevinphos, methyl parathion, ethyl parathion, phenthoate, diazinon and malathion were prepared in diluted acetone. Subsequently, 20th instar larvae of *Aedes aegypti* (L.) were submitted to increasing levels of the insecticides in aqueous solutions at 100 ml, approximately. The dose x mortality curves were drawn from the percentages of mortality obtained after 24 hours, through linear regression as in BLISS (1935). Three spray applications, spaced at 7-day intervals, were conducted on lettuce. The following insecticides, with toxic quantities expressed in % active ingredient/vol., were employed for each application: dichlorvos EC 100, 0.075%; mevinphos CS 24, 0.036%; methyl parathion EC 60, 0.042%; ethyl parathion EC 60, 0.024%; phenthoate EC 50, 0.090%; diazinon WP 40, 0.052%; malathion EC 50, 0.105%. Deposit or residue levels were determined in samples, collected immediately after the last treatment, and also after 1, 3, 7 and 14 days. The bioassay was determined by the following safety intervals: 1 and 7 days for each malathion and ethyl parathion respectively. In the cases of methyl parathion, mevinphos and diazinon, it will be necessary to effect clean-up of the extracts. Due to the fact that Brazilian laws do not set tolerance limits for dichlorvos and phenthoate it was not possible to establish safety intervals.

INTRODUÇÃO

O estudo da persistência residual de inseticidas em produtos agrícolas que se destinam à alimentação humana e animal, constitui na atualidade, uma das principais preocupações das autoridades sanitárias mundiais.

A bio-análise com diversos organismos sensíveis a inseticidas tem possibilitado a avaliação da eficiência de vários produtos tóxicos

¹Extraído da Dissertação apresentada à ESALQ-USP, pelo primeiro autor, para obtenção do título de "Mestre" em Entomologia.

²Universidade Federal Rural de Pernambuco. 50.000 Recife, Pernambuco.

³Departamento de Entomologia da ESALQ-USP. 13.400 Piracicaba, SP.

e sinergistas, bem como a presença de resíduos de inseticidas no solo, vegetais e produtos de origem animal. NOLAN & WILCOXON(1950), BUSHLAND (1951) e BURCHFIELD & HARTZELL(1955) utilizaram inseticidas orgânicos sintéticos em ensaios biológicos com larvas de *Aedes aegypti*(L.); PIGATTI & MELLO(1961) e PIGATTI et alii(1961), larvas de *Culex pipiens fatigans* Wied e Roberts et alii(1962), adultos de *Drosophila melanogaster* Meig.

Diferentes métodos analíticos tem sido empregados na avaliação de resíduos de inseticidas em alface: paratiom etílico (SLOAN, 1951 e SMITH et alii, 1952); parathiom etílico e malatiom (COFFIN, 1966); malatiom(SMITH et alii, 1954 e 1955 e RICHARDSON & WESTDAL, 1963); mevinfos e diazinom(COFFIN & MCKINLEY, 1964); fosfamidom(MENZER & DITMAN, 1963) e monocrotofos e dicrotofos(GIANG & BECKMAN, 1968).

Objetiva-se com o presente trabalho, a avaliação quantitativa de resíduos de inseticidas organo-fosforados em alface, pela bio-análise com larvas de *Aedes aegypti*(L.), visando o estabelecimento de intervalos de segurança.

MATERIAIS E MÉTODOS

a) Estabelecimento das curvas dosagem x mortalidade

Utilizou-se como organismo-experimental, larvas de *A. aegypti*(L.) no 4º ínstar, obtidas da criação permanente do Departamento de Entomologia da ESALQ-USP.

A técnica adotada consistiu em submergir 20 larvas do inseto-teste à concentrações crescentes dos inseticidas diclorvos, mevinfos, paratiom metílico, paratiom etílico, fentoato, diazinom e malatiom, diluídos em acetona destilada, em soluções aquosas de 100 ml aproximadamente. Foram empregadas duas repetições para cada nível de diluição; parcelas testemunhas receberam 1 ml de acetona destilada. As curvas do sagem x mortalidade foram locadas a partir das % de mortalidade obtidas, 24 horas após a exposição aos tóxicos e de conformidade com BLISS (1935). Foram consideradas mortas as larvas que ao serem tocadas com um bastão de vidro, mostraram-se incapazes de executar movimentos natatórios apreciáveis.

b) Aplicação dos inseticidas

Em cultura de alface, variedade Babá, de horta comercial localizada em Piracicaba - SP, procedeu-se 3 pulverizações a alto volume, espaçadas de 7 dias, iniciando-se-as em 28/8/73. Utilizaram-se 18 plantas por parcela e 2 repetições por tratamento, incluindo uma testemunha localizada em canteiro separado. Cada preparação inseticida recebeu 2 ml do espalhante adesivo Novapal/litro de calda. Foram utilizados os seguintes tratamentos: diclorvos 100 CE, 0,075% p.a.; mevinfos 24 SC; 0,036%; paratiom metílico 60 CE, 0,042%; paratiom etílico 60 CE, 0,024%; fentoato 50 CE, 0,090%; diazinom 40 PM, 0,052%; melatiom 50 CE, 0,105%.

c) Avaliação dos depósitos ou resíduos

Empregou-se o método analítico proposto por LAUG(1946) com algumas modificações. Do material colhido e armazenado em congelador, tomou-

-se 50 g de folhas trituradas, procedendo-se a extração dos tóxicos com 150 ml de éter de petróleo destilado (ponto de ebulição de 30-65°C) e 60 g de sulfato de sódio anidro, mediante homogeneização durante 4 minutos. O material resultante foi filtrado com 15 g do referido sal. Para fins analíticos, trabalhou-se com 75 ml do filtrado, inserindo-o num evaporador rotativo à vácuo, à temperatura de 42±2°C, até restar 5 ml do material, aproximadamente. A seguir, removia-se o solvente remanescente com o auxílio de uma bomba de ar comprimido. Os depósitos ou resíduos dissolvidos em 5 ml de acetona destilada foram utilizados na determinação biológica dos inseticidas. Avaliaram-se os depósitos ou resíduos em amostras colhidas logo em seguida ao último tratamento e com 1, 3, 7 e 14 dias. Considerou-se como depósitos os níveis tóxicos detectados nas duas primeiras amostragens.

Dos extratos dissolvidos em acetona destilada, provenientes de 50 g de amostras testemunhas, tomou-se alíquotas a fim de verificar-se a interferência dos materiais co-extraídos nos resultados analíticos. Verificou-se que uma alíquota de 0,5 ml não provocava nenhuma interferência, sendo portanto considerada segura a sua utilização em todas as análises realizadas.

Para comprovação experimental da validade do método de bio-análise empregado, submeteu-se 50 g de amostras testemunhas à extração com quantidades conhecidas dos inseticidas técnicos, dissolvidos em éter de petróleo destilado.

Em todas as análises efetuadas, foram utilizadas 20 larvas do *A. aegypti* no 4º instar, submersas em soluções aquosas de 100 ml.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As curvas dosagem x mortalidade estão representadas nas Figuras 1 a 7. O Quadro 1 sumaria os valores LC₅₀ dos inseticidas, equações de regressão e respectivos ângulos, obtidos para a população experimental de larvas do *A. aegypti*. As Figuras de 8 a 11 mostram as curvas de de gradação de paratíon metílico, paratíon etílico, fentoato e diazinom, respectivamente e no Quadro 2 observa-se um resumo das avaliações dos depósitos ou resíduos dos inseticidas em estudo nas diversas amostragens.

Para diclorvos detectou-se depósitos iniciais de 6,9 e 2,8 ppm e resíduos de 2,4 ppm aos 3 dias. Nas outras amostragens não foram de terminados resíduos. Não havendo limite de tolerância estabelecido no Brasil, fica impossibilitada a avaliação do intervalo de segurança. No entanto, uma limpeza do extrato concorreria, provavelmente, para aumentar a sensibilidade do método analítico, fornecendo subsídios que no futuro possam ser utilizados nos estudos de persistência do produto.

Mevinfos aos 3 dias ainda acusou resíduos prejudiciais superiores ao limite de tolerância, fixado em 0,5 ppm de acordo com a resolução da Comissão Permanente de Aditivos para Alimentos do Ministério da Saúde, referente ao Decreto 55.871/65. A partir de uma semana, o método não os detectou. Os resultados contrariam as informações de PIGATTI et alii (1967), COFFIN & MCKINLEY (1964), HUDDLESTON & CYRISCO (1962) e ATKINS et alii (1961) em couve-flor, alface, alfafa e frutos de laranja, respectivamente. Em face do exposto, possivelmente ocorreu uma influência dos materiais co-extraídos, alterando a resposta do organismo. As

sim, o extrato carece de uma limpeza rigorosa. Novas pesquisas poderiam ser desenvolvidas através de métodos biológicos ou outros mais precisos para comprovação dos resultados observados, pois conforme GIANNOTTI et alii(1972), o intervalo de segurança para mevinfos varia de 1 a 3 dias e, em casos excepcionais pode atingir 14 dias. Nas condições do ensaio não se pôde determinar o intervalo de segurança.

Paratiom metílico apresentou com 1 semana, resíduos acima do limite de tolerância, que é de 1 ppm, e aos 14 dias não foram detectados. Atentando-se para a Figura 8 vê-se que é impossível fixar-se com precisão o período de carência, mas com boa margem de segurança, próximo aos 14 dias, os resíduos que porventura possam existir não comprometeriam a saúde dos consumidores. GIANNOTTI et alii(1972) indicam como intervalo de segurança 7 a 14 dias, estando de acordo com os resultados alcançados.

Resíduos de paratiom etílico atingiram o limite de tolerância de 1 ppm aos 7 dias e no 14º dia apresentaram-se muito abaixo(Figura 9). As observações indicam a colheita segura do vegetal a partir de 7 dias, sem o perigo de intoxicações. SMITH et alii(1952) e COFFIN(1966) observaram a persistência deste produto por 3 semanas e resíduos de 0,1 ppm após 4 dias, respectivamente, em alface. Os dados coligidos no presente trabalho, concordam com GIANNOTTI et alii(1972).

Foram detectados resíduos de fentoato em todas as amostragens. Devido a inexistência do limite de tolerância e período de carência para o produto no Brasil, a Figura 10 não possibilita informações seguras sobre a época da colheita do vegetal. Segundo MONTECATINI EDISON S.p.a. (1967), o tóxico decresce rapidamente em maçãs e peras, atingindo 0,3 ppm após a colheita. DE PIETRI-TONELLI & BARONTINI(1962/63) avaliaram resíduos inferiores a 1 ppm em maçãs, 1 dia após a última aplicação.

A situação de diazinom foi idêntica a mevinfos, apresentando resíduos acima do limite de tolerância correspondente a 0,75 ppm no 3º dia. De modo similar não foi possível a fixação do intervalo de segurança. Assim, são válidas as indicações sobre a limpeza de extratos, bem como o uso de larvas de menor idade fisiológica, tendo em vista a relativa sensibilidade do organismo experimental a diazinom. COFFIN & MCKINLEY(1964) determinaram resíduos inferiores a 0,1 ppm deste inseticida em alface aos 10 dias. Os resultados observados não podem ser comparados com GIANNOTTI et alii(1972).

Malatiom apesar de fornecer depósito inicial de 18 ppm, na segunda amostragem, o nível do tóxico estava abaixo do limite de tolerância de 8 ppm (Figura 11). As observações são comparáveis com os trabalhos de RICHARDSON & WESTDAL(1963), COFFIN(1966) e SMITH et alii (1954) em alface e PIGATTI & AMARAL(1960) em cogumelos crus e cozidos. Deste modo, recomenda-se a utilização da hortaliça a partir do 1º dia, concordando com GIANNOTTI et alii(1972).

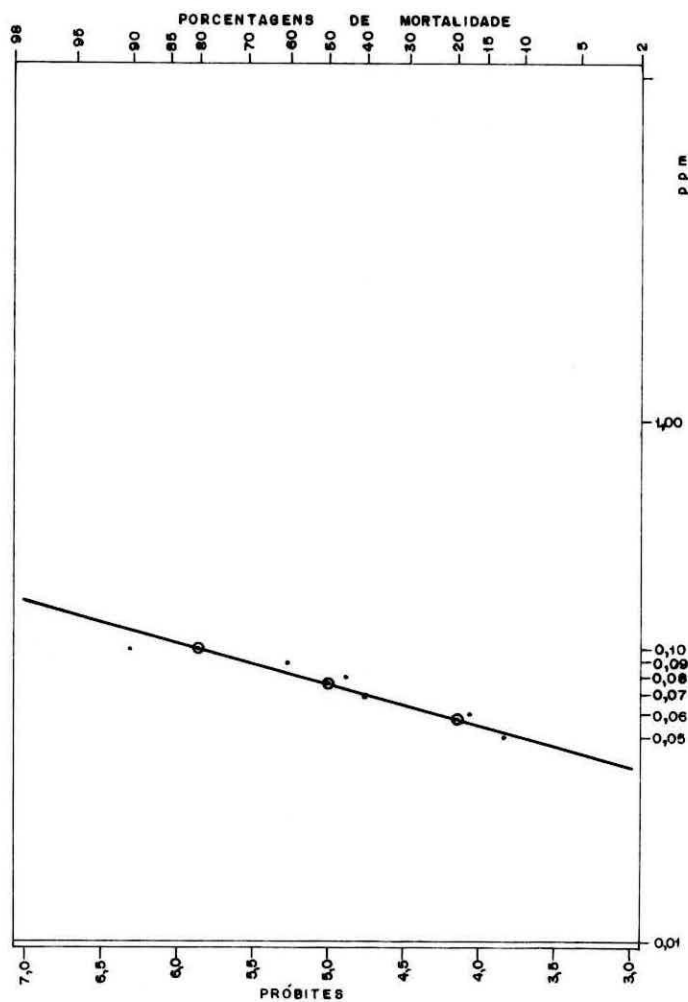


FIGURA 1 - Curva dosagem x mortalidade de diclorvos para larvas do 4º instar de *A. aegypti* (L.). Piracicaba, São Paulo, Brasil, 1973.

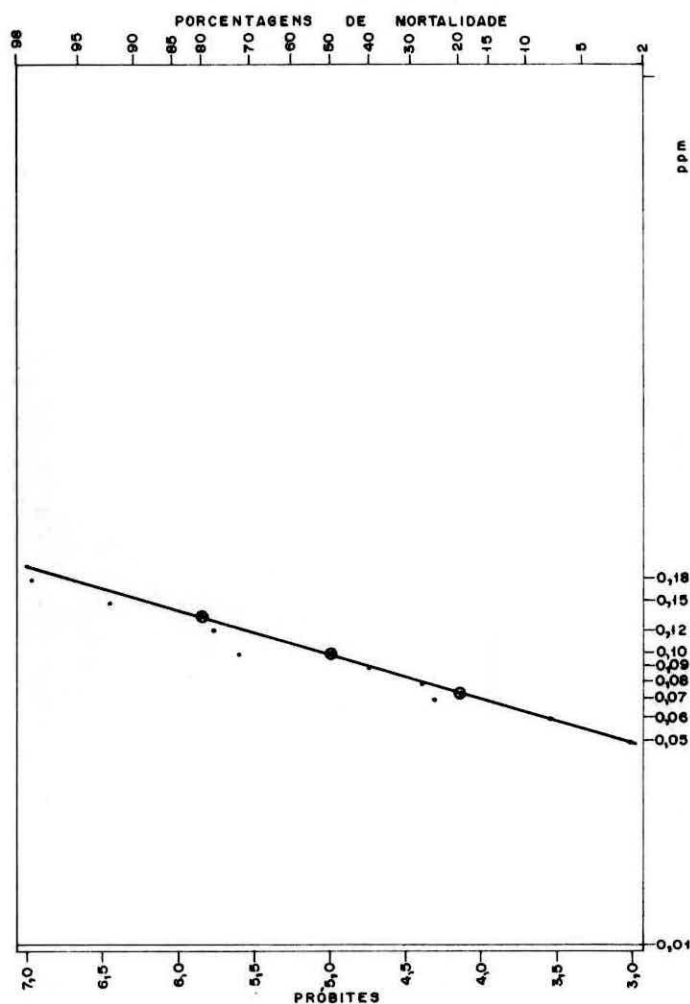


FIGURA 2 - Curva dosagem x mortalidade de mevinfos para larvas do 4º instar de *A. aegypti* (L.). Piracicaba, São Paulo, Brasil, 1973.

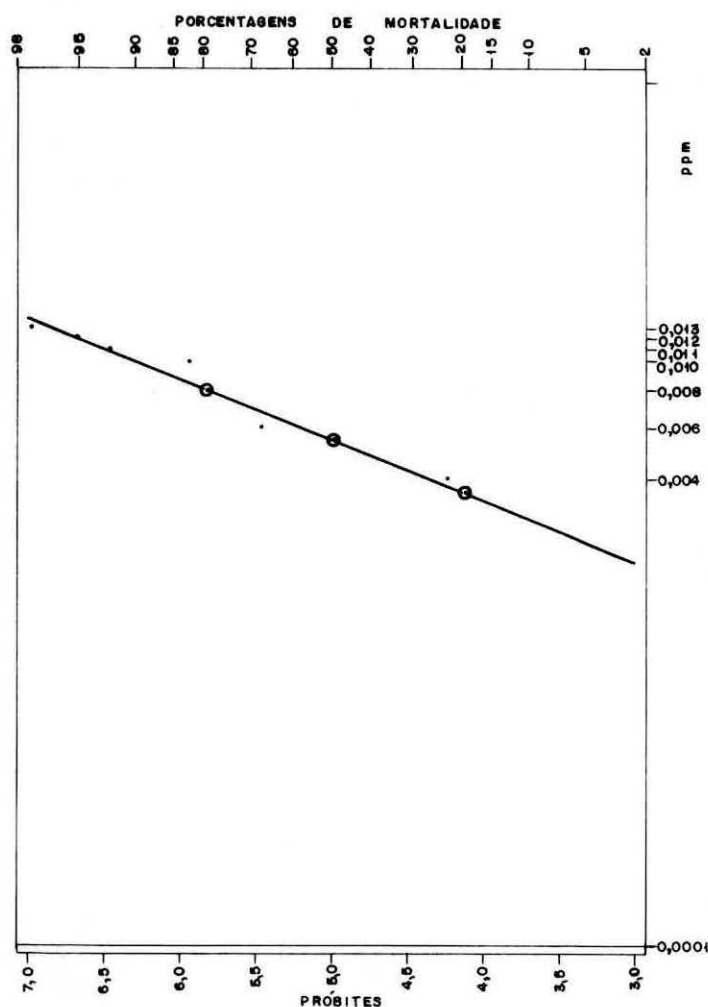


FIGURA 3 - Curva dosagem x mortalidade de paratíon metílico para larvas do 4º instar de *A. aegypti* (L.). Piracicaba, São Paulo, Brasil, 1973.

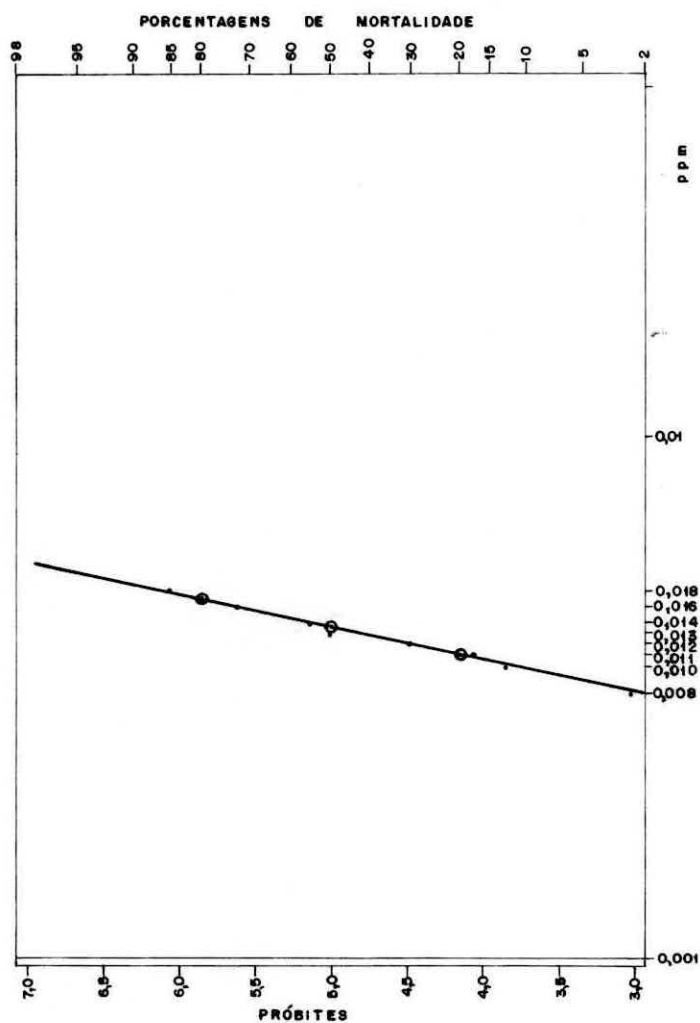


FIGURA 4 - Curva dosagem x mortalidade de paratíon etílico para larvas do 4º instar de *A. aegypti* (L.). Piracicaba, São Paulo, Brasil, 1973.

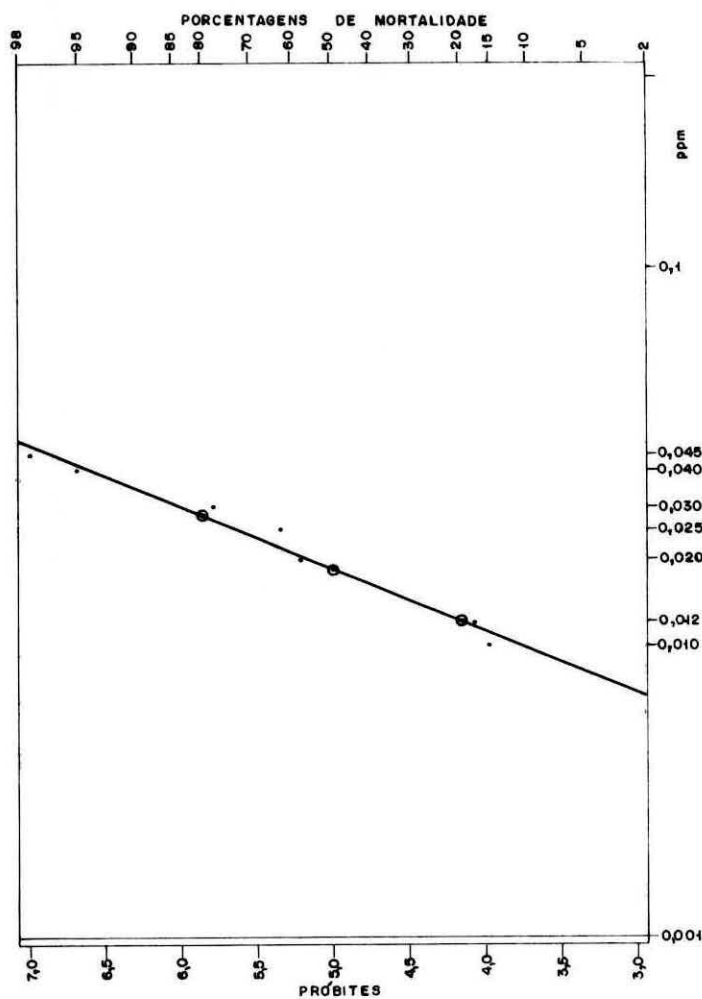


FIGURA 5 - Curva dosagem x mortalidade de fentoato para larvas do 4º instar de *A. aegypti* (L.). Piracicaba, São Paulo, Brasil, 1973.

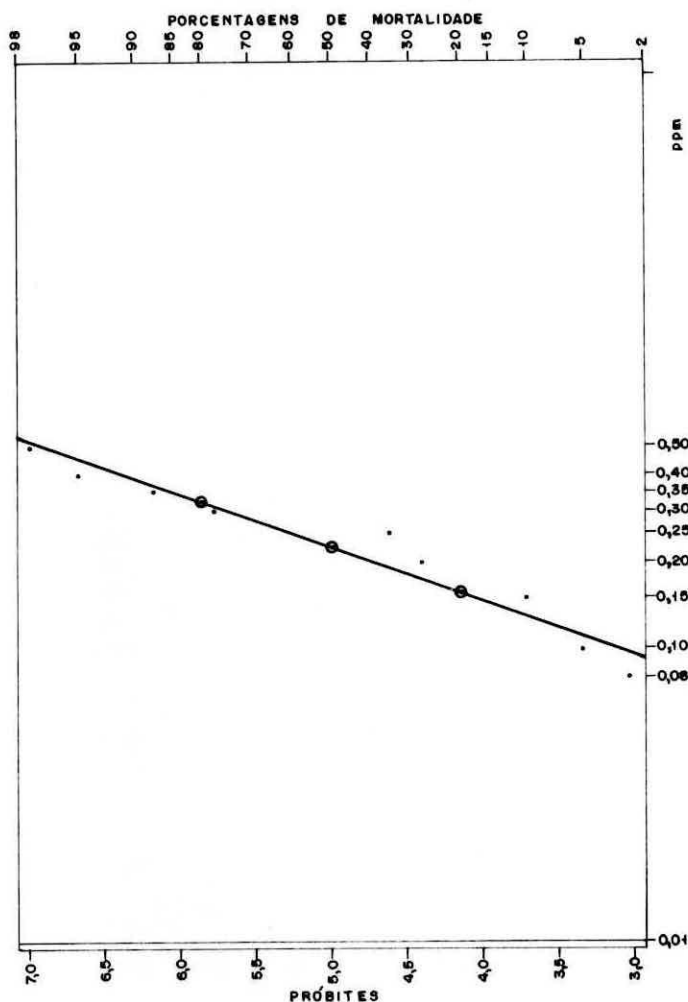


FIGURA 6 - Curva dosagem x mortalidade de diazinom para larvas do 4º instar de *A. aegypti* (L.). Piracicaba, São Paulo, Brasil, 1973.

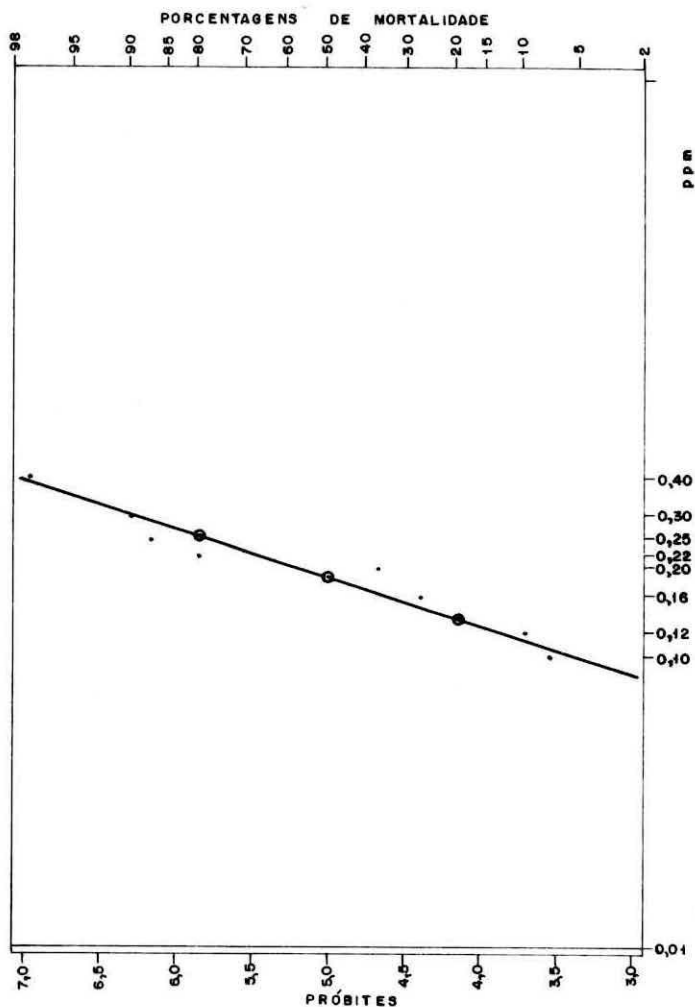


FIGURA 7 - Curva dosagem x mortalidade de malatium para larvas do 4º instar de *A. aegypti* (L.). Piracicaba, São Paulo, Brasil, 1973.

QUADRO 1 - Toxicidade dos inseticidas organo-fosforados e equações de regressão da população experimental de larvas do 4º instar de *A. aegypti*. Piracicaba, São Paulo, Brasil, 1973.

Inseticidas	Valores LC ₅₀ (ppm)	Tangentes trigonométricas	Ângulos	Equações de regressão
diclorvos	0,076	7,397	82°18'	$\hat{y} = 1,538 + 7,397 \log 100 x$
mevinfos	0,099	6,773	81°36'	$\hat{y} = 1,761 + 6,773 \log 100 x$
paratiom metílico	0,0054	4,780	78°11'	$\hat{y} = 1,481 + 4,780 \log 1000x$
paratiom etílico	0,0137	8,719	83°27'	$\hat{y} = 4,881 + 8,719 \log 1000x$
fentoato	0,0186	4,573	77°40'	$\hat{y} = 3,772 + 4,573 \log 100 x$
diazinon	0,227	5,421	79°33'	$\hat{y} = 2,358 + 5,421 \log 100 x$
malatiom	0,185	6,337	81°02'	$\hat{y} = 3,039 + 6,337 \log 100 x$

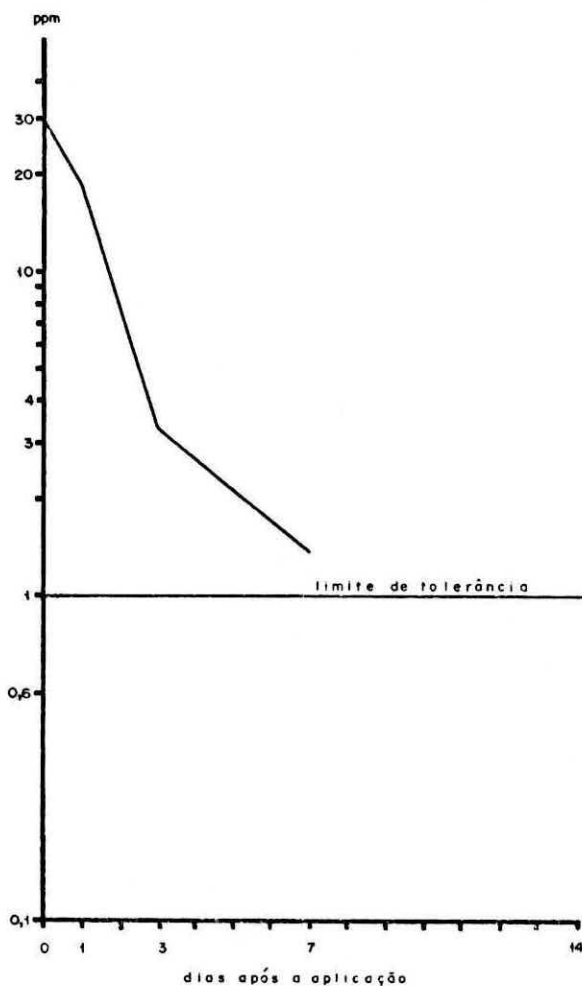


FIGURA 8 - Resíduos de paratiom metílico em alface. Piracicaba, São Paulo, Brasil, 1973.

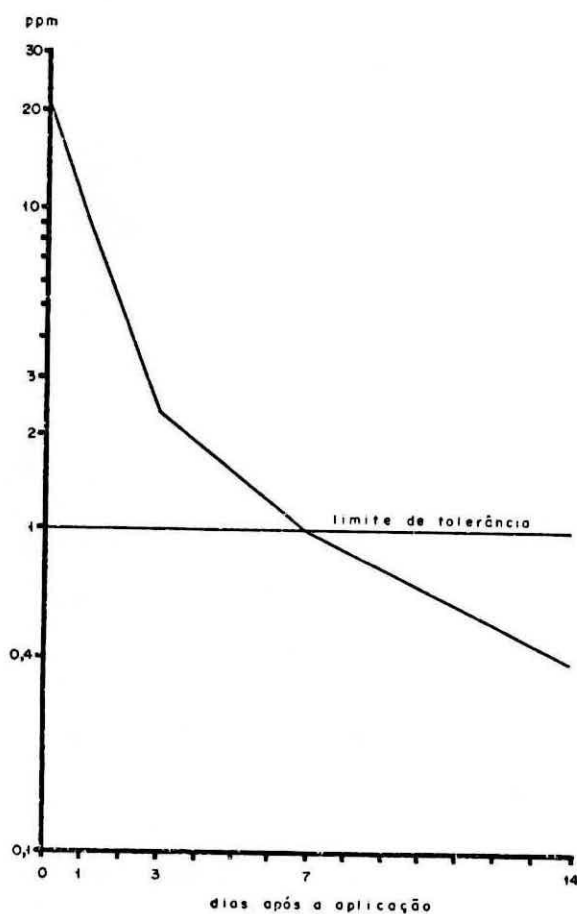


FIGURA 9 - Resíduos de paratiom etílico em alface.
Piracicaba, São Paulo, Brasil, 1973.

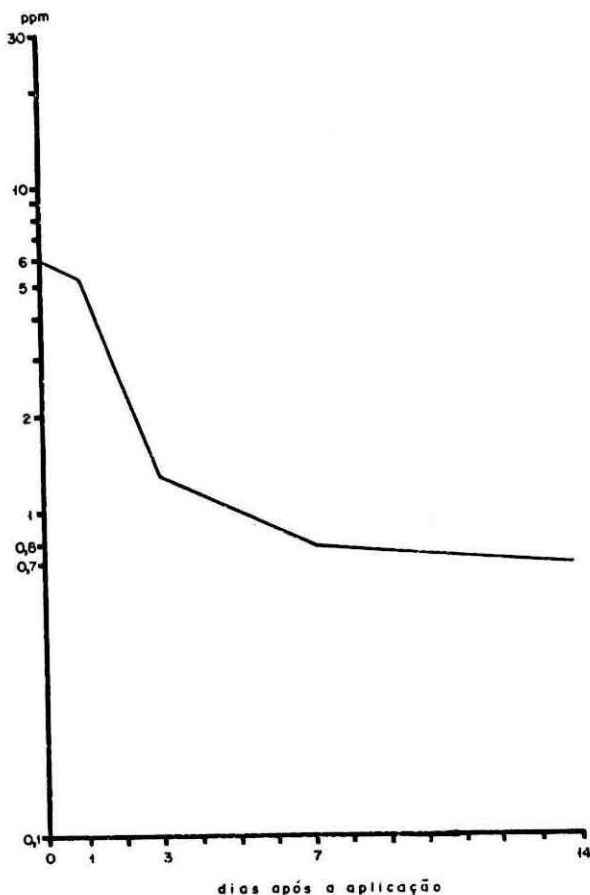


FIGURA 10 - Resíduos de fentoato em alface. Piracicaba, São Paulo, Brasil, 1973.

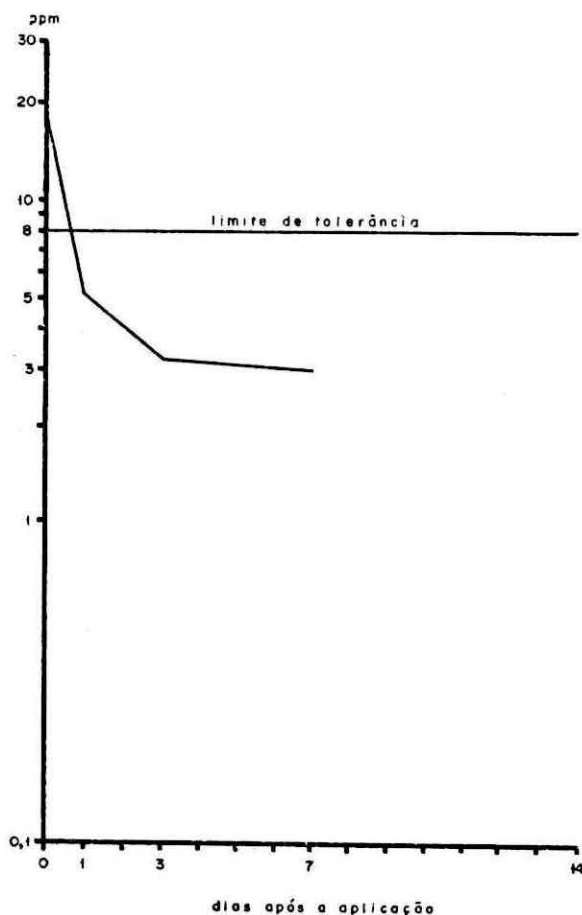


FIGURA 11 - Resíduos de malatiom em alface. Piraci
caba, São Paulo, Brasil, 1973.

QUADRO 2 - Resíduos de inseticidas organo-fosforados em alface.
Piracicaba, São Paulo, Brasil, 1973.

Tratamentos	Resíduos, ppm				
	Intervalos a partir da última aplicação				
	logo após	1 dia	3 dias	7 dias	14 dias
diclorvos	6,9	2,8	2,4	N.D	N.D*
mevinfos	5,2	4,9	4,3	N.D	N.D
paratiom metílico	29,8	18,7	3,3	1,4	N.D
paratiom etílico	20,9	9,5	2,3	1,0	0,4
fentoato	6,0	5,3	1,3	0,8	0,7
diazinon	12,0	4,4	3,2	N.D	N.D
malatium	18,0	5,1	3,3	3,0	N.D

N.D = Não detectável.

CONCLUSÕES

1. O método biológico empregado permite avaliar períodos de carência para os inseticidas paratiom etílico e malatium em alface;
2. Com relação a mevinfos, paratiom metílico e diazinon, a limpeza de extratos é necessária para uma maior eficiência na determinação dos seus níveis residuais;
3. Para diclorvos, dependendo do futuro estabelecimento do limite de tolerância, o método parece não ser indicado na estimativa dos seus resíduos, a menos que se proceda a uma limpeza do extrato;
4. Com fentoato, o método revela-se eficiente sem exigir limpeza do extrato, embora não exista limite de tolerância fixado no Brasil.

AGRADECIMENTOS

O primeiro autor expressa a sua gratidão à Coordenação do Aperfeiçoamento do Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de uma bolsa de estudos de Pós-Graduação, durante os anos de 1972 e 1973.

LITERATURA CITADA

- ABBOT, W.S. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *J. Econ. Entomol.*, 18:265-267, 1925.
- ATKINS JR., E.L.; BLINN, R.C.; FUKUTO, T.R.; GUNTHER, F.A. Residues on oranges resulting from the use of DDT, parathion, phosdrin and TDE for the control of orangeworms. *J. Econ. Entomol.*, 54(3):455-456,

1961.

- BLISS, C.I. The calculation of the dosage-mortality curves. *Ann. Appl. Biol.*, Crambridge, 22:134-167, 1935.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos. *Resíduos de pesticidas em alimentos*. Brasília, 1972. 47p.
- BURCHFIELD, H.P. & HARTZELL, A. A new bioassay method for evaluation of insecticide residues. *J. Econ. Entomol.*, 48(2):210-214, 1955.
- BUSHLAND, R.C. Attempts to utilize mosquito larvae in a bioassay method for insecticide residues in animal products. *J. Econ. Entomol.*, 44(3):421-423, 1951.
- COFFIN, D.E. Oxidative metabolism and persistence of parathion and malathion on field-sprayed lettuce. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, Washington, 49(5):1018-1021, 1966 apud *Hort. Abstr.*, Farnham Royal, 37:364, 1967.
- _____ & MCKINLEY, W.P. The metabolism and persistence of systox, diazinon and phosdrin on field-sprayed lettuce. *J. Assoc. Off. Agric. Chem.*, Washington, 47:632-640, 1964 apud *Hort. Abstr.*, Farnham Royal, 35:377, 1965.
- DE PIETRI-TONELLI, P. & BARONTINI, A. Modo d'azione e residui dell'esterile etilico dell'acido O,O-dimetilditio-fosforilacetico (L 561, Cidial) nella lotta contro la *Carpocapsa pomonella* L. *Contr. Ist. Ric. Agr.*, Milano, 6:58-80, 1962/63 apud *R. Appl. Entomol.*, Ser. A, London, 54:93, 1966.
- GIANG, B.Y. & BECKMAN, H.P. Determination of Bidrin, Azodrin, and their metabolites with thermionic detector. *J. Agric. Fd. Chem.*, Easton, 16(6):899-902, 1968.
- GIANNOTTI, O.; ORLANDO, A.; PUZZI, D.; CAVALCANTE, R.D.; MELLO, E.R.J. Noções básicas sobre praguicidas: generalidades e recomendações de uso na agricultura do Estado de São Paulo. *O Biológico*, São Paulo, 38(8/9):223-339, 1972.
- HUDDLESTON, E.W. & GYRISCO, G.G. Residues of phosdrin on alfalfa and its effectiveness on the insect complex. *J. Econ. Entomol.*, College Park, 51(1):209-210, 1961.
- LAUG, E.P. A biological assay method for determining 2, 2 bis(p-chlorophenyl), 1, 1, 1, trichloroethane (DDT). *J. Pharmac. Exper. Ther.*, Baltimore, 86:324, 1946.
- MENZER, R.E. & DITMAN, L.P. Phosphamidon residue studies on various crops. *J. Econ. Entomol.*, College Park, 56(1):89-92, 1963.
- MONTECATINI EDISON S.P.A. Milano. *Cidial*. Milano, 1967. 60p.
- NOLAN, K. & WILCOXON, F. Method of bioassay for traces of parathion in plant materials. *Agric. Chem.*, Baltimore, 5(1):53-74, 1950.
- PIGATTI, A. & AMARAL, J.F. Determinação de resíduos em cogumelos tratados com inseticidas. *Arch. Inst. Biol.*, São Paulo, 27:35-41, 1960.
- _____ & MELLO, E.J.R. Ação dos inseticidas orgânicos sobre larvas do mosquito *Culex pipiens fatigans* Wied. e sobre moscas domésticas (*Musca domestica* L.) no Município de São Paulo. *Arch. Inst. Biol.*, São Paulo, 28:101-112, 1961.
- _____ ; ORLANDO, A.; GARRUTI, R.S. Determinação de resíduos e eventuais alterações de gosto em tubérculos de batatinha cultivados em solo tratado com inseticidas. *Arch. Inst. Biol.*, São Paulo, 28:40-51, 1961.

- _____; PIGATI, P.; CAMARGO, L.S. Resíduos de mevinphos em couve-flor. *O Biológico*, São Paulo, 33(9):200-203, 1967.
- RICHARDSON, H.P. & WESTDAL, P.H. Control of the six-spotted leaf - hopper, *Macrosteles fascifrons*, and aster yellows on head lettuce in Manitoba. *Can. J. Pl. Sci.*, Ottawa, 43(1):12-17, 1963.
- ROBERTS, J.E.; CHISHOLM, R.D.; KOBLITSKY, L. Persistence of insecticides in soil and their effects on cotton in Georgia. *J. Econ. Entomol.*, College Park, 55(2):153-155, 1962.
- SLOAN, M.J.; RAWLINS, W.A.; NORTON, L.B. Factors affecting the loss of DDT and parathion residues on lettuce. *J. Econ. Entomol.*, College Park, 44(5):710-719, 1951.
- SMITH, F.F.; EDWARDS, F.I.; GIANG, P.; FULTON, R.A. Residues of organic phosphorus compounds and DDT on greenhouse vegetables. *J. Econ. Entomol.*, College Park, 45(4):703-707, 1952.
- _____; GIANG, P.; FULTON, R.A. Residues of malathion on greenhouse lettuce and tomatoes and on green onions. *J. Econ. Entomol.*, College Park, 47(1):183-185, 1954.
- _____; TAYLOR, E.A. Reduction on malathion residues on vegetables by washing. *J. Econ. Entomol.*, College Park, 48(2):209, 1955.

RESUMO

Prepararam-se soluções dos inseticidas técnicos diclorvos, mevinfos, paratiom metílico, paratiom etílico, fentoato, diazinom e malatíom em acetona destilada. Submeteu-se, posteriormente, 20 larvas do *Aedes aegypti* (L.) no 4º instar a concentrações crescentes destes inseticidas em soluções aquosas de 100 ml aproximadamente. As curvas dosagem x mortalidade foram locadas a partir das percentagens de mortalidade observadas, 24 horas após a exposição aos tóxicos, através de regressão linear e de conformidade com BLISS(1935).

Foram efetuadas 3 pulverizações a alto volume com intervalos de 7 dias em alface. Utilizaram-se os seguintes tratamentos com suas respectivas concentrações expressas em % do princípio ativo/vol para cada aplicação: diclorvos CE 100, 0,075%; mevinfos SC 24, 0,036%; paratiom metílico CE 60, 0,042%; paratiom etílico CE 60, 0,024%; fentoato CE 50, 0,090%; diazinom PM 40, 0,052% e malatíom CE 50, 0,105%.

Níveis de depósitos ou resíduos foram avaliados em amostras colhidas imediatamente após a última pulverização e com 1, 3, 7 e 14 dias. Foi possível o estabelecimento dos períodos de carência de 1 a 7 dias para malatíom e paratiom etílico, respectivamente. Nos casos de paratiom metílico, mevinfos e diazinom é necessário limpeza de extrato para uma mais perfeita avaliação dos seus resíduos. Devido a inexistência do limite de tolerância para fentoato no Brasil, não foi possível a fixação do intervalo de segurança.